



**University of
Zurich**^{UZH}

**Zurich Open Repository and
Archive**

University of Zurich
University Library
Strickhofstrasse 39
CH-8057 Zurich
www.zora.uzh.ch

Year: 2017

Einsatz von eDNA im Amphibien-Monitoring

Schmidt, Benedikt R ; Grünig, C R

Abstract: Monitoring ist ein unverzichtbarer Teil des Naturschutzes, denn Monitoring informiert über den Zustand der Biodiversität und liefert so die notwendigen Grundlagen für die Evaluation der praktischen Naturschutzarbeit und für die zu ergreifenden Schutzmassnahmen. Während klassische Monitorings mittels Nachweis von Arten oder Artengruppen direkt im Feld durchgeführt werden, sind kürzlich Methoden entwickelt worden, welche Umwelt-DNA (eDNA) für den Artnachweis verwenden. Im vorliegenden Artikel geben wir einen Überblick über eDNA-Methoden und deren Eignung für Monitorings, mit speziellem Fokus auf den Nachweis von Amphibien in Gewässern.

Posted at the Zurich Open Repository and Archive, University of Zurich

ZORA URL: <https://doi.org/10.5167/uzh-142598>

Journal Article

Published Version

Originally published at:

Schmidt, Benedikt R; Grünig, C R (2017). Einsatz von eDNA im Amphibien-Monitoring. WSL Berichte, 60:57-62.



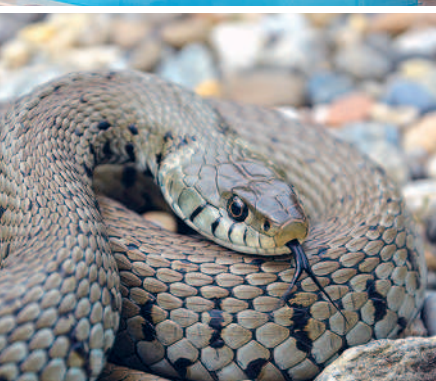
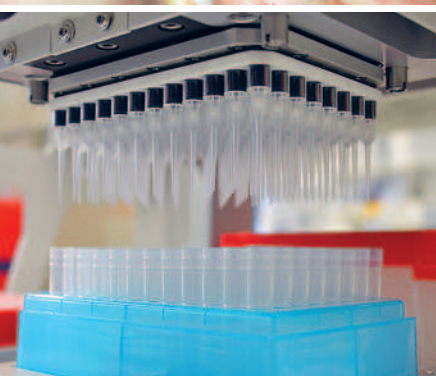
Heft 60, 2017

WSL Berichte

ISSN 2296-3588

FORUM
für Wissen

2017



Naturschutzgenetik

Redaktion

Daniela Csencsics

Felix Gugerli



Eidg. Forschungsanstalt für Wald, Schnee und Landschaft WSL
CH-8903 Birmensdorf

Einsatz von eDNA im Amphibien-Monitoring

Benedikt R. Schmidt^{1,2} und Christoph R. Grünig^{3,4}

¹ Koordinationsstelle für Amphibien- und Reptilienschutz in der Schweiz (Info Fauna Karch), Passage Maximilien-de-Meuron 6, CH-2000 Neuchâtel

² Institut für Evolutionsbiologie und Umweltwissenschaften, Universität Zürich, Winterthurerstrasse 190, CH-8057 Zürich

³ Microsynth AG, Schützenstrasse 15, CH-9436 Balgach

⁴ Ecogenics GmbH, Schützenstrasse 15, CH-9436 Balgach
benedikt.schmidt@unine.ch, christoph.gruenig@microsynth.ch

Monitoring ist ein unverzichtbarer Teil des Naturschutzes, denn Monitoring informiert über den Zustand der Biodiversität und liefert so die notwendigen Grundlagen für die Evaluation der praktischen Naturschutzarbeit und für die zu ergreifenden Schutzmassnahmen. Während klassische Monitorings mittels Nachweis von Arten oder Artengruppen direkt im Feld durchgeführt werden, sind kürzlich Methoden entwickelt worden, welche Umwelt-DNA (eDNA) für den Artnachweis verwenden. Im vorliegenden Artikel geben wir einen Überblick über eDNA-Methoden und deren Eignung für Monitorings, mit speziellem Fokus auf den Nachweis von Amphibien in Gewässern.

1 Einleitung

Monitoring ist ein unverzichtbarer Teil des Naturschutzes, denn Monitoring informiert über den Zustand der Biodiversität und liefert so die notwendigen Grundlagen für die Evaluation der praktischen Naturschutzarbeit und für die zu ergreifenden Schutzmassnahmen (Yoccoz *et al.* 2001; Weber *et al.* 2004). Grundsätzlich können in einem Monitoringprogramm verschiedene Elemente der Biodiversität (Gene, Arten, Ökosysteme) untersucht werden, wie dies beispielsweise im Biodiversitätsmonitoring Schweiz der Fall ist, aber oft wird nur die Präsenz/Absenz, manchmal auch die Häufigkeit (Abundanz) von Arten in Untersuchungsflächen erfasst. Präsenz/Absenz-Daten reichen für die Zielsetzung vieler Monitoringprogramme aus und sind meist vergleichsweise einfach und kostengünstig zu erheben.

Feldbiologen haben für den Nachweis von Arten eine Vielzahl von Methoden entwickelt, die auf die jeweilige taxonomische Gruppe ausgerichtet sind. Manche Tiergruppen, wie etwa Vögel, können einfach über Sichtbeobachtungen oder Gesang erfasst werden. Manchmal, wie etwa bei Schmetterlingen, sind Sichtbeobachtungen möglich, aber der Fang der Individuen ist notwendig für eine sichere Artbestimmung. Im Falle der Amphibien kann

ein Teil der Arten über Sichtbeobachtungen oder über das Quaken nachgewiesen werden, aber für manche weniger gut nachweisbare Arten (z.B. Molche) ist der Fang mit dem Kescher oder das Stellen von Fallen notwendig. Je nach Aktivität, Phänologie und Lebensweise der Arten erfolgt der Nachweis tagsüber oder es ist Nacharbeit notwendig. Trotz bewährten Methoden ist bekannt, dass nie alle Arten, die an einem Ort vorkommen, entdeckt werden (Kéry und Schmidt 2008). Daher wird versucht, Methoden zu entwickeln, welche die Nachweisbarkeit von Arten verbessern, beziehungsweise bei ressourcenintensiven Erhebungen eine Vereinfachung zu erzielen.

Artnachweis über Umwelt-DNA (eDNA) ist eine relativ neue Methode, die viele Vorteile hat (Thomsen *et al.* 2012; Schmidt und Ursenbacher 2015). Bei eDNA sammelt man beispielsweise eine Wasserprobe in einem Gewässer und untersucht diese dann auf das Vorhandensein von DNA der gesuchten Art (Meier und Stapper 2017, in diesem Band). Zudem sind, wie später gezeigt wird, auch eDNA-basierte Methoden vorhanden, welche nicht nur eine, sondern gleichzeitig viele Arten nachweisen können, was aus Monitoring-Perspektive besonders interessant ist. Manche Autoren vertreten die Ansicht, dass eDNA die Erfassung der Biodiversität revolutionieren könne (Deiner

et al. 2016). Ein Beispiel aus den USA zeigt das grosse Potenzial des Artnachweises durch eDNA. In Gewässern um Chicago wird intensiv nach invasiven Fischarten gesucht, damit diese nicht in die Grossen Seen gelangen. Zwei der unerwünschten Arten sind der Silberne Tolstolob (*Hypophthalmichthys molitrix*) und der verwandte Gelfleckte Tolstolob (*Hypophthalmichthys nobilis* bzw. *Aristichthys nobilis*). Mit eDNA konnten die Arten nachgewiesen werden, aber es waren anschliessend 93 Personentage Elektrofischerei notwendig, um ein einziges Exemplar dieser grossen Fische zu fangen. Dieses Beispiel zeigt, dass eDNA herkömmlichen Methoden, je nach Kontext, für den Artnachweis überlegen sein kann.

Amphibien standen schon früh im Fokus von Studien zur Anwendbarkeit von eDNA, denn bereits eine der ersten Arbeiten wies den invasiven Amerikanischen Ochsenfrosch (*Lithobates catesbeianus*) mit Hilfe von eDNA nach (Ficetola *et al.* 2008). Die Publikation von Thomsen *et al.* (2012) weckte das Interesse an eDNA bei vielen Ökologen; auch diese Arbeit verwendete Amphibien als Modellorganismen (Kammolch [*Triturus cristatus*] und Knoblauchkröte [*Pelobates fuscus*]). Hier beschreiben wir die Anwendung von eDNA als Nachweismethode für Amphibien in stehenden und fliessenden kleinen Gewässern.

2 Was ist Umwelt-DNA (eDNA)?

Umwelt-DNA oder eDNA (environmental DNA) bezeichnet Erbsubstanz von Organismen, welche in Umweltproben gefunden wird und nicht mehr direkt einem Individuum zugeordnet

werden kann (BOHMANN *et al.* 2014; SCHMIDT und URSENBACHER 2015; BALDIGO *et al.* 2017). Diese eDNA kann einerseits in freien DNA-Molekülen in der Umwelt vorliegen oder aber immer noch Bestandteil von Zellen sein, welche Lebewesen ausscheiden oder von ihrer Oberfläche verlieren. So ist zum Beispiel bekannt, dass der Mensch rund 40000 verhornte Hautzellen pro Minute verliert. Ebenso werden Zellen von Individuen bei Körperausscheidungen (z.B. Urin, Kot, Drüsenausscheidungen) in die Umwelt abgegeben. Die Ausscheiderate von eDNA dürfte damit einerseits von der Art (Grösse und weitere artspezifische Charakteristika) als auch von der Anzahl Individuen einer Art in einem Gewässer abhängen. Allerdings fehlen dazu noch verlässliche Daten für Amphibien, und unseres Wissens wurden noch keine spezifischen Untersuchungen bei Amphibien durchgeführt, welche die Ausscheiderate von eDNA zwischen Amphibienarten untersucht haben.

Die ausgeschiedene eDNA verbreitet sich danach passiv durch Strömungen in den Gewässern. Dabei ist die eDNA biotischen und abiotischen Umwelteinflüssen ausgesetzt, was zum Abbau der eDNA führt. Dadurch werden die ursprünglich langen DNA-Moleküle zunehmend in kleine Bruchstücke zerteilt oder auch ganz abgebaut. Wie schnell dieser Prozess stattfindet, hängt wesentlich davon ab, wie gut die DNA gegenüber Umwelteinflüssen geschützt ist. So wurde gezeigt, dass Fisch-eDNA in Gewässern während rund 14 Tagen nachweisbar ist, während in Sedimentproben noch nach 132 Tagen nach Entnahme der Fische die entsprechende eDNA nachgewiesen werden konnte (TURNER *et al.* 2015).

Bei der Entnahme von Wasserproben aus einem Gewässer kann die vorhandene eDNA direkt aus dem Wasser gewonnen werden. Dabei werden aus praktischen Gründen relativ kleine Mengen entnommen (einige ml). Mit diesem Verfahren wird neben der freien DNA im Wasser auch DNA isoliert, welche noch in Zellen eingeschlossen ist und als Schwebepartikel im Wasser vorkommt. Als weitere Methode wird oftmals ein Filtrations-schritt verwendet, und die DNA wird aus dem Niederschlag auf dem Filter gewonnen. Bei dieser Methode kön-

nen grössere Mengen Wasser verarbeitet werden. Allerdings geht die freie eDNA verloren, da diese nicht auf dem Filter zurückbleibt. Zudem ist eine Filtration von Wasserproben bei vielen Schwebepartikeln (z.B. Phytoplankton) schwierig, da die feinporigen Filter schnell verstopfen. In beiden Fällen wird die DNA von allen im Gewässer vorkommenden Arten in der Probe gewonnen, also auch DNA von Bakterien, Pilzen, Insekten, Algen, (Wasser-) Vögeln, Fischen und Säugetieren inklusive dem Menschen. Bei einem Monitoringprojekt für Amphibien in Gewässern wird daher nur eine sehr kleine Menge der vorhandenen DNA von Amphibien stammen und damit den Nachweis erschweren.

3 Nachweis-Methoden bei eDNA Proben

Da eDNA (normalerweise) in sehr kleinen Mengen und in kurzen DNA-Stückchen vorliegt, erfolgt der Nachweis mittels der Vervielfältigung (Amplifikation) einer kurzen Region auf der DNA (ca. 70–150 Basenpaare), dies analog zur molekularen Diagnostik von Krankheitserregern in der Medizin oder Anwendungen in der Forensik. Je nach wissenschaftlicher Fragestellung können dazu verschiedene Techniken eingesetzt oder kombiniert werden. Dabei sind sowohl methoden-technische Überlegungen wie auch solche zu Kosten entscheidend bei der Methodwahl.

Mithilfe der Polymerasen-Ketten-Reaktion (PCR/quantitative PCR) genannten Methode kann man ausgewählte Regionen der DNA vervielfältigen. Dadurch kann man vereinfacht gesagt eine «vorhanden/nicht vorhanden»-Aussage betreffend dem Vorkommen von Arten machen. Der methodische Ansatz (Assay) kann spezifisch für eine Gattung, Art oder Unterart entwickelt werden. Dabei ist entscheidend, dass der Ansatz validiert ist und unter anderem die Nachweisgrenze oder nicht gewünschte Vervielfältigung von nahe verwandten Arten oder Artengruppen überprüft wird, da diese die Aussagekraft der Ergebnisse beeinträchtigen würden (MACDONALD und SARRE 2017). PCR/qPCR ist insbeson-

dere dann die Methode der Wahl, wenn spezifisch eine oder wenige Arten in eDNA-Proben nachgewiesen werden sollen, da nach der methodischen Entwicklung des Ansatzes die Kosten für die eigentlichen Analysen verhältnismässig gering sind. Ein Beispiel dafür ist der Nachweis des Erregers der Chytridiomykose (der Chytridpilz *Batrachochytrium dendrobatidis*) von Amphibien in Wasserproben (SCHMIDT *et al.* 2013) oder aber der Nachweis nur des Kammolchs (THOMSEN *et al.* 2012).

Sobald jedoch über die eDNA Aussagen über ganze Artengruppen oder deren Zusammensetzung gemacht werden sollen, so werden kurze Regionen der DNA mittels PCR vervielfältigt und anschliessend mithilfe von Next-Generation Sequencing (NGS) sequenziert (Abb. 1A). Dabei wird der zu vervielfältigende Abschnitt auf der DNA so gewählt, dass seine Enden für die Artengruppe einheitlich sind und dazwischen eine möglichst grosse Vielfalt vorhanden ist, sodass man die einzelnen Arten in der Artengruppe unterscheiden kann. Diese vielfältige Region kann dann als Barcode für die einzelnen Arten dienen (Barcoding; MACDONALD und SARRE 2017; Abb. 1B). Dabei muss aber beachtet werden, dass die einheitlichen Enden nicht zu stark einheitlich sind, da ansonsten alles vervielfältigt wird, also zum Beispiel auch menschliche DNA, welche praktisch in jeder eDNA-Probe in grossen Mengen vorliegt und den Nachweis von Arten beeinträchtigen kann. Zudem sollte der untersuchte Abschnitt möglichst kurz sein (wenn möglich auch in mehreren Kopien pro Zelle vorliegen), damit die Sensitivität der Analyse erhöht wird. Aus diesem Grund liegen viele der gebräuchlichsten Barcoding-Regionen auf der DNA der Mitochondrien (mtDNA), der Ribosomen (rDNA) oder, im Falle der Pflanzen, der Chloroplasten (LITTLE 2014; MEUSINIER *et al.* 2008; BELLEMAIN *et al.* 2010).

Nach der Vervielfältigung des Barcoding-DNA-Abschnitts, werden bei dieser Methode Tausende von einzelnen DNA-Stücken sequenziert. Diese stammen von verschiedenen Arten. Bei den anschliessenden (bioinformatischen) Analysen wird den einzelnen Sequenzen, welche von einer Wasserprobe stammen, durch einen Vergleich

mit einer Referenzdatenbank mit entsprechenden und überprüften DNA-Sequenzen der Artengruppe die Art zugewiesen. Die Referenzdatenbank und die darin abgebildeten Arten (und Artnamen!) sind also enorm wichtig für die Qualität der Analyse. Wenn in der Referenzdatenbank eine falsche Art-Sequenz vorhanden ist, zum Beispiel durch eine falsche Bestimmung, so führt auch die Analyse zu falschen Zuordnungen (Kap. 4).

Ein weiterer Vorteil der eDNA ist, dass, sobald die eDNA-Isolation erfolgt ist, mehrere Analysen durchgeführt werden können, da meist genügend gewonnene DNA vorhanden ist. Damit können je nach Fragestellung mehrere Artengruppen analysiert werden oder ein Einzelarten-Nachweis kann mit einem Multi-Arten-Nachweis kombiniert werden. Dies wäre zum Beispiel dann der Fall, wenn die Amphibien-Gemeinschaft in den Proben ermittelt würde und parallel dazu die Probe auf das Vorkommen des pathogenen Chytridpilzes *Batrachochytrium dendrobatidis* getestet wird oder aber weitere

Artengruppen wie zum Beispiel die Libellen untersucht würden.

4 Herausforderungen bei der Analyse von eDNA-Proben

eDNA hat ihre Stärken, aber auch Schwächen, wie dies mit allen Methoden zum Artnachweis der Fall ist (KÉRY und SCHMIDT 2008). Auch mit eDNA weist man die Zielart oder die Zielarten nicht immer nach, obwohl diese vorkommt (sogennante «falsch-negative»-Befunde; SCHMIDT *et al.* 2013; BOHMANN *et al.* 2014). Die Nachweiswahrscheinlichkeit ist dabei wesentlich von drei Faktoren beeinflusst (bei sonst gleichbleibender Beprobungsstrategie): (i) der Anzahl Individuen im Gewässer und deren räumlichen Verteilung im Gewässer, (ii) der eDNA-Ausscheiderate der Art und (iii) allfälligen Inhibitoren, das sind chemische Substanzen, welche die Vervielfältigung der DNA in der PCR erschweren (z.B. Humin-Säuren in Mooreseen).

Während man versucht, durch eine adäquate Beprobungsstrategie im Feld die Punkte (i) und (ii) zu berücksichtigen, wird bei den Laboranalysen bei jeder Probe eine Inhibitionskontrolle durchgeführt, damit man falsch-negative Resultate, welche nur auf PCR-Inhibition beruhen, erkennt (Punkt iii). Die Nachweiswahrscheinlichkeit mittels eDNA ist in der Regel hoch (um 90 %), aber nur mit hohem Aufwand nahe bei 100 Prozent (BIGGS *et al.* 2015; VALENTINI *et al.* 2016). Hoher Aufwand bedeutete in einer Studie von BIGGS *et al.* (2015) zum Nachweis von Amphibien zwanzig Wasserproben pro Weiher. Diese Proben wurden gemischt und davon sechs Proben genommen. Anschliessend wurde jede Probe mit 12 qPCRReaktionen analysiert. Alles in allem also ein sehr grosser Aufwand. Der Zusammenhang zwischen Anzahl Individuen und falsch negativen Resultaten konnte durch FICETOLA *et al.* (2008) aufgezeigt werden, da grosse Populationen mit vielen Individuen des Amerikanischen Ochsenfrosches besser nachweisbar waren als kleine Popu-



Abb. 1. Ablauf einer eDNA-Analyse zu einem Artengruppen-Nachweis mittels Next-GenerationSequencing. (A) Nach der Probenahme von eDNA in einem Gewässer wird die gesamte eDNA in der Wasserprobe gewonnen (Extraktion), die Barcoding-Region mittels PCR vervielfältigt (Amplifikation) und dann mittels Next-Generation Sequencing sequenziert. Im Anschluss werden die Daten bioinformatisch ausgewertet und den DNA-Sequenzen die jeweiligen Artnamen (z.B. Amphibienarten) zugewiesen. (B) Aufbau einer Barcoding-Region mit den für die Zielgruppen einheitlichen Enden (hier v.a. rot) und dem sehr vielfältigen Bereich, welcher als Barcode dient (hier v.a. blau und schwarz).

lationen. Daraus ergibt sich, dass mehrere Proben oder eine Mischprobe pro Gewässer auf jeden Fall für einen sicheren Artnachweis notwendig sind beziehungsweise ist.

Ein weiteres Problem, welches bei Kartierungen und Monitoring-Programmen vorkommt, sind falsch-positive Befunde, das heisst der Nachweis einer Art an einem Ort, an dem sie gar nicht vorkommt. Bei den herkömmlichen Methoden kann das passieren, wenn man eine Art falsch bestimmt oder verwechselt bzw. wenn die Feldprotokolle fehlerhaft sind. Falsche Positive wurden auch bei eDNA-Anwendungen diskutiert und nachgewiesen (LAHOZ-MONTFORT *et al.* 2016). Auch wenn die Fehleraten in der Regel klein sind (FICETOLA *et al.* 2015), so können sie doch die aus den Daten abgeleiteten Vorkommen einer Art verzerren. Dies ist insbesondere dann der Fall, wenn eine Art selten ist (LAHOZ-MONTFORT *et al.* 2016). Bei eDNA-Analysen können verschiedene Faktoren zu falsch positiven Resultaten führen, welche nur zum Teil beeinflusst werden können. Es sind das (i) Eintrag von eDNA in ein Gewässer, beispielsweise Fisch-DNA durch Wasservogel, oder ein Fliessgewässer beziehungsweise der Verbleib der DNA im Gewässer, auch wenn die Art nicht mehr im Gewässer ist – sozusagen ein unverschuldeter falsch-positiver Befund – und (ii) Kontaminationen mit fremder DNA bei der Beprobung im Feld und bei den Arbeiten im Labor. Damit Kontaminationen minimiert werden, ist es sehr wichtig, dass sehr sauber gearbeitet wird. Dies bedingt einerseits eine optimale Sammelstrategie im Feld (z.B. Verwendung von Einweg-Sammelmaterial), wie auch besondere Vorsichtsmassnahmen im Labor. Dabei gibt es aus der genetischen Diagnostik für die Laborarbeit Richtlinien, wie eine Kontamination minimiert werden kann (z.B. ISO 17025-Richtlinien für DNA-Analytik).

Bei der Interpretation der eDNA-Analysen ist es wichtig, auch die Verweildauer von eDNA im Wasser beziehungsweise Sediment zu berücksichtigen. Im Wasser bleibt eDNA etwa zwei Wochen erhalten (DEJEAN *et al.* 2011; THOMSEN *et al.* 2012). Im Sediment hingegen kann sie deutlich länger erhalten bleiben und liegt auch in höherer Konzentration vor, da die DNA hier

vor schädlichen Einflüssen besser geschützt ist (TURNER *et al.* 2015; siehe Kap. 2). Wenn eDNA also aus Wasserproben genommen wird, dann zeigt sie praktisch das gegenwärtige Vorkommen einer Art an. Wenn bei der Probenentnahme jedoch Sediment aufgewirbelt wird, so kann eDNA die Präsenz einer Art anzeigen, die schon länger nicht mehr im Gewässer vorkommt. Je nach Fragestellung kann dies ein Problem sein oder aber auch ein Vorteil; auf jeden Fall sollte man sich aber dessen bewusst sein. Zum Beispiel sollten Beprobungen von Gewässern nach starken Winden, welche Sediment aufwirbeln können, vermieden werden.

Wie bei den Feldbegehungen für eine klassische Artenbestimmung sind auch bei eDNA-Arbeiten detaillierte Artenkenntnisse wichtig. Zum Beispiel kann eine falsche Zuordnung eines Artnamens von einem falschen Eintrag in der Referenzdatenbank, einem zu unspezifischen methodischen Ansatz im Labor, Hybridisierungen oder durch sehr nah verwandte Arten oder Artenkomplexe verursacht werden. In diesem Falle ist es wichtig, sich der methodischen Grenzen des Artnachweises mit eDNA bewusst zu sein. Beispielsweise ist aus Untersuchungen bekannt, dass in der Region des Genfersees durch Hybridisierung zwar viele Individuen des Kammolchs noch das Mitochondrien-Erbgut von *Triturus cristatus* besitzen, allerdings das Erbgut im Zellkern weitgehend durch das Erbgut von *T. carnifex* ersetzt wurde (DUFRESNES *et al.* 2016). Allerdings sind solche Einblicke in die Evolution der Arten nur mittels wissenschaftlichen Studien realisierbar und sprengen den Rahmen von praktischen Monitorings. Zudem sind solch detaillierte Kenntnisse, welche für die Interpretation von eDNA Analysen wichtig sein können, meist nur für gut studierte Artengruppen vorhanden. Dies ist aber nicht der Normalfall, denn viele Artengruppen, wie zum Beispiel Libellen, sind weniger gut erforscht.

Während die oben erwähnten Punkte unabhängig der Nachweismethode (Einzel-Artennachweis oder Nachweis von Gemeinschaften) relevant sind, so ergeben sich beim Nachweis von Gemeinschaften einige spezifische Punkte. Ganz besonders wichtig ist eine qua-

litativ hochstehende Referenzdatenbank, welche DNA-Sequenzen enthält, welche von durch Artenspezialisten bestimmten Individuen stammen. Dies ist vor allem dann wichtig, wenn die Bestimmung einer Art über ihr Aussehen anspruchsvoll ist. Dagegen sollten die zugänglichen DNA-Sequenzdatenbanken nur ergänzend verwendet werden, da sie oftmals falsche Sequenzen und Bestimmungen enthalten.

Im Falle der Amphibien wurde im Rahmen eines KTI-Projektes zwischen universitären Partnern, dem Umweltbüro ARNAL und Microsynth/ecogenics ein Barcoding-System für den eDNA-Nachweis von Amphibien (ohne den Alpensalamander) in Gewässern entwickelt und getestet (MEIER und STAPFER 2017, in diesem Band). Dieses zeigt eine gute Auflösung der Amphibienarten. Innerhalb des «Wasserfrosch»-Komplexes kann gezeigt werden, dass mit dem vorhandenen Barcoding-Ansatz zwar nicht alle sechs *Pelophylax*-Arten, doch immerhin vier Gruppen erkannt werden (z.B. *Pelophylax bedrigae*, *P. bergeri*, *P. esculentus-lessonae*-Komplex und *P. kurtmuelleri-ridibundus*-Komplex). Im Feld ist dagegen mit herkömmlichen Methoden eine solche Auflösung des «Wasserfrosch»-Komplexes nicht zu erreichen. Dies ist ein klarer Vorteil der eDNA.

5 Vergleich zwischen eDNA und klassischem Monitoring

Eine wichtige Frage ist, wie gut eDNA ist im Vergleich mit den herkömmlichen Feldmethoden, welche seit langem zum Einsatz kommen. Mehrere Studien haben gezeigt, dass die Nachweiswahrscheinlichkeiten bei eDNA höher sein können als bei den traditionellen Methoden (SCHMIDT und URSENBACHER 2015). Daher lohnt sich aus dem Blickwinkel der Nachweiswahrscheinlichkeiten der Einsatz von eDNA. Allerdings liegen für Amphibien bisher noch keine Daten hinsichtlich des Vorkommens von falsch-positiven Resultaten vor. Bei der Methodenauswahl für ein Monitoring respektive auch bei der Kombination von verschiedenen Methoden müssen die Ziele des Monitorings genau definiert werden. Es sind zwar Bestre-

bungen im Gang, eDNA in diese Richtung zu entwickeln, doch zurzeit können Abundanzen nur sehr grob abgeschätzt werden (THOMSEN *et al.* 2012). eDNA liefert ebenfalls keine Hinweise auf das Lebensstadium (bei Amphibien Adulte, Larven etc.). Daher lässt sich über eDNA beispielsweise nicht nachweisen, ob sich eine Amphibienart erfolgreich in einem Gewässer fortpflanzt. Auch Alter, Grösse oder Gesundheitszustand kann eDNA, mindestens bei Amphibien, nicht liefern. Sofern für ein Monitoring derartige Merkmale wichtig sind, sollte eDNA nur ergänzend eingesetzt werden.

Weitere wichtige Punkte beim Einsatz von eDNA sind Zeit und Kosten. Die Probenentnahme für eDNA hat meist folgende Vorteile im Vergleich zu einem herkömmlichen Monitoring: (i) kleinerer Zeit-Bedarf pro Gewässer, (ii) grössere Unabhängigkeit von der Witterung und der Tageszeit (jedoch nicht von der Jahreszeit!) und damit die Möglichkeit, Beprobungen von mehreren Gewässern an einem Tag durchzuführen und keine Nacharbeit einsetzen zu müssen sowie (iii) allenfalls weniger Besuche am Gewässer, als bei klassischem Monitoring. Dafür entstehen neben der eigentlichen Arbeitszeit im Feld noch zusätzlich Kosten für die Analysen im Labor. Zudem dauern die Laboranalysen mehrere Wochen, da im Labor die parallele Bearbeitung von möglichst vielen Proben am einfachsten und billigsten ist. Daher lohnt es sich, die Kosten der unterschiedlichen Methoden genau abzuklären (SMART *et al.* 2016). Letztlich ist es wie bei jedem Projekt wichtig, dass man sich darüber klar wird, welches die Projektziele sind und welche Methoden am besten geeignet sind, diese Ziele zu erreichen (Yoccoz *et al.* 2001).

6 Ausblick

Trotz rasantem Fortschritt bei der Methodenentwicklung ist eDNA noch eine neue Methode. Die methodischen Entwicklungen bei der eDNA werden weiter gehen und diese mit grosser Wahrscheinlichkeit in Zukunft noch interessanter machen. Es ist jetzt bereits möglich, viele Artengruppen in einer Wasserprobe zu erfassen (DEINER *et al.*

2016). Abhängig ist dies von der Verfügbarkeit von DNA-Sequenzen in den entsprechenden Datenbanken, wobei es sich lohnt, für ausgewählte Artengruppen eigene und überprüfte Referenzdatenbanken aufzubauen. Bestrebungen in diese Richtung werden zum Beispiel durch die Forscher und Forscherinnen im Swiss Barcode of Life Projekt verfolgt (www.swissbol.ch). Allerdings zeigt sich dabei, dass die verwendeten Barcoding-Regionen nicht unbedingt für eDNA-Analysen von Gemeinschaften mittels Next-Generation Sequencing geeignet sind. Daher kann durch das gezielte Sequenzieren interessanter Arten die Grundlage geschaffen werden, dass weitere Artengruppen, welche auch in Amphibiengewässern vorkommen (z.B. Libellen, Wasserpflanzen oder national prioritäre Arten), erfasst werden können. Später wird vielleicht ein umfassendes Monitoring der aquatischen Biodiversität möglich.

Die Anwendung genetischer Methoden bei naturschutzbiologischen Feldstudien und Monitoringprogrammen versetzt manche Biologen und Artenkennerinnen in Angst, denn sie haben das Gefühl, dass sie durch die neuen Techniken ersetzt würden. Wir sehen diese Gefahr nicht, da es für die Probenentnahme wie auch die Interpretation der Daten ausgewiesene Fachpersonen mit detaillierten Artenkenntnissen braucht. Aber wir sind der Überzeugung, dass genetische Methoden ein wertvolles Werkzeug in der Naturschutzbiologie sein können und zunehmend auch sein werden.

7 Literatur

BALDIGO, B.P.; SPORN, L.A.; GEORGE, S.D.; BALL, J.A., 2017: Efficacy of environmental DNA to detect and quantify Brook trout populations in headwater streams of the Adirondack Mountains, New York. *Trans. Amer. Fish. Soc.* 146: 99–111.

BELLEMAIN, E.; CARLSEN, T.; BROCHMANN, C.; COISSAC, E.; TABERLET, P.; KAUSERUD, H., 2010: ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbio.* 10: 189.

BIGGS, J.; EWALD, N.; VALENTINI, A.; GABORIAUD, C.; DEJEAN, T.; GRIFFITHS, R.A.;

FOSTER, J.; WILKINSON, J.W.; ARNELL, A.; BROTHERTON, P.; WILLIAMS, P.; DUNN, F., 2015: Using eDNA to develop a national citizen science-based monitoring programme for the great crested newt (*Triturus cristatus*). *Biol. Conserv.* 183: 19–28.

BOHMANN, K.; EVANS, A.; GILBERT, M.T.; CARVALHO, G.R.; CREER, S.; KNAPP, M.; YU, D.W.; DE BRUYN, M., 2014: Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends Ecol. Evol.* 29: 358–367.

DEINER, K.; FRONHOFER, E.A.; MÄCHLER, E.; WALSER, J.C.; ALTERMATT, F., 2016: Environmental DNA reveals that rivers are conveyor belts of biodiversity information. *Nature Comm.* 7: 12544.

DEJEAN, T.; VALENTINI, A.; DUPARC, A.; PELLIER-CUIT, S.; POMPANON, F.; TABERLET, P.; MIAUD, C., 2011: Persistence of environmental DNA in freshwater ecosystems. *PLoS ONE* 6: e23398.

DUFRESNES, C.; PELLET, J.; BETTINELLI-RICCIARDI, S.; THIÉBAUD, J.; PERRIN, N.; FUMAGALLI, L., 2016: Massive genetic introgression in threatened northern crest newts (*Triturus cristatus*) by an invasive congener (*T. carnifex*) in western Switzerland. *Conserv. Gen.* 17: 839–846.

FICETOLA, G.F.; MIAUD, C.; POMPANON, F.; TABERLET, P., 2008: Species detection using environmental DNA from water samples. *Biol. Lett.* 4: 423–425.

FICETOLA, G.F.; PANSU, J.; BONIN, A.; COISSAC, E.; GIGUET-COVEX, C.; DE BARBA, M.; GIELLY, L.; LOPES, C.M.; BOYER, F.; POMPANON, F.; RAYÉ, G.; TABERLET, P., 2015: Replication levels, false presences and the estimation of presence/absence from eDNA metabarcoding data. *Mol. Ecol. Res.* 15: 543–556.

KÉRY, M.; SCHMIDT, B.R., 2008: Imperfect detection and its consequences for monitoring for conservation. *Comm. Ecol.* 9: 207–216.

LAHOZ-MONTFORT, J.J.; GUILLERA-ARROITA, G.; TINGLEY, R., 2016: Statistical approaches to account for false-positive errors in environmental DNA samples. *Mol. Ecol. Res.* 16: 673–685.

LITTLE, D.P., 2014: A DNA mini-barcode for land plants. *Mol. Ecol. Res.* 14: 437–446.

MACDONALD, A.J.; SARRE, S.T., 2017: A framework for developing and validating taxon-specific primers for specimen identification from environmental DNA. *Mol. Ecol. Res.* 17: 708–720.

MEIER, R.; STAPPER, A., 2017: Werkzeugkasten für genetische Methoden in der Biodiversitätsförderung. *WSL Ber.* 60: 49–56.

- MEUSNIER, I.; SINGER, G.A.C.; LANDRY, J.F.; HICKEY, D.A.; HEBERT, P.D.N.; HAJIBABAEI, M., 2008: A universal DNA mini-barcode for biodiversity analysis. *BMC Genomics* 9: 214.
- SCHMIDT, B.R.; KÉRY, M.; URSENBACHER, S.; HYMAN, O.J.; COLLINS, J.P., 2013: Site occupancy models in the analysis of environmental DNA presence/absence surveys: a case study of an emerging amphibian pathogen. *Methods Ecol. Evol.* 4: 646–653.
- SCHMIDT, B.R.; URSENBACHER, S., 2015: Umwelt-DNA als neue Methode zum Artenachweis in Gewässern. *Z. Feldherpetol.* 22: 1–10.
- SMART, A.S.; WEEKS, A.R.; VAN ROOYEN, A.R.; MOORE, A.; MCCARTHY, M.A.; TINGLEY, R., 2016: Assessing the cost-efficiency of environmental DNA sampling. *Methods Ecol. Evol.* 7: 1291–1298.
- THOMSEN, P.F.; KIELGAST, J.; IVERSEN, L.L.; WIUF, C.; RASMUSSEN, M.; GILBERT, M.T.P.; ORLANDO, L.; WILLERSLEV, E., 2012: Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Mol. Ecol.* 21: 2565–2573.
- TURNER, C.R.; UY, K.L.; EVERHART, R.C., 2015: Fish environmental DNA is more concentrated in aquatic sediments than surface water. *Biol. Conserv.* 183: 93–102.
- WEBER, D.; HINTERMANN, U.; ZANGGER, A., 2004: Scale and trends in species richness: considerations for monitoring biological diversity for political purposes. *Global Ecol. Biogeo.* 13: 97–104.
- VALENTINI, A.; TABERLET, P.; MIAUD, C.; CIVADE, R.; HERDER, J.; THOMSEN, P.F.; BELLEMAIN, E.; BESNARD, A.; COISSAC, E.; BOYER, F.; GABORIAUD, C.; JEAN, P.; POULET, N.; ROSET, N.; COPP, G.H.; GENIEZ, P.; PONT, D.; ARGILLIER, C.; BAUDOUIN, J.-M.; PEROUX, T.; CRIVELLI, A.J.; OLIVIER, A.; ACQUEBERG, M.; LE BRUN, M.; MOLLER, P.R.; WILLERSLEV, E.; DEJEAN, T., 2016: Next generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Mol. Ecol. Res.* 25: 929–942.
- YOCOZ, N.G.; NICHOLS, J.D.; BOULINIER, T., 2001: Monitoring of biological diversity in space and time. *Trends Ecol. Evol.* 16: 446–453.

Abstract

Use of environmental DNA in amphibian monitoring

Monitoring is an essential part of conservation biology because the results of monitoring programs inform management decisions and allow an assessment of the effectiveness of conservation action. Classical monitoring methods are based on direct observations of species or species groups in the field. However, these field studies can be very labour-intensive and there are many species which are hard to monitor due to their natural history. New methods were recently developed where the species are detected based on DNA present in the environment (eDNA). In the present article we give an overview of monitoring methods of aquatic organisms based on eDNA and discuss the advantages and limitations of these methods with a strong focus of monitoring amphibian species in ponds and wetlands.

Keywords: environmental DNA (eDNA), DNA barcoding, conservation biology, monitoring